

Establishment of a high throughput BK channel screening method and discovery of BK channel modulators

著者	井戸 克俊
内容記述	Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (A), no. 6587, 2013.3.25 Includes supplementary treatises Includes bibliographical references (leaves 54-61)
発行年	2013
その他のタイトル	BK channel大量スクリーニングシステムの確立およびBK channel modulator探索に関する研究
URL	http://hdl.handle.net/2241/120485

氏 名 (本籍)	井 戸 克 俊 (愛 知 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 6587 号		
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Establishment of a high throughput BK channel screening method and discovery of BK channel modulators (BK channel 大量スクリーニングシステムの確立および BK channel modulator 探索に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	榊 正 幸
副 査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	本 間 真 人
副 査	筑波大学助教	博士 (神経科学)	小金澤 禎 史
副 査	筑波大学教授	医学博士	久 賀 圭 祐

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

イオンチャネルを標的とした創薬は、パッチクランプ法などの高度な技術が必要とし、化合物の評価に時間がかかることから、他の創薬分野と比べて遅れていた。近年、オートメーション・パッチクランプ法が開発され、イオンチャネルの多数検体測定が進歩したが、至適な測定条件を見出すことが難しいチャネルも存在する。カルシウムイオン依存性カリウムチャネルの 1 つである BK チャネルは、細胞内カルシウムイオン濃度に依存して活性化されるが、オートメーション・パッチクランプ法では細胞内 Ca^{2+} 濃度を制御できないため、安定した電流を記録することが困難である。そこで、本研究は、Ionworks Quattro を用いて BK チャネル電流を安定して記録できる条件を探し、大量評価系を確立すること、および、その評価系を用いて、新規 BK チャネル開口薬を探索し、同定することを目的とした。

(対象と方法)

CHO-K1 細胞に BK チャネル α サブユニットをコードする KCNN1 遺伝子を導入して BK チャネルを発現させ、Ionworks Quattro を用いてチャネル活性を測定した。カルシウムキレート剤である BAPTA-AM の存在下または非存在下で、Ionomycin (カルシウムイオノフォア) を添加し、5 分後に -90 mV から +100 mV までステップパルスを与えて、誘発される電流を測定した。化合物のスクリーニングは、試験化合物を添加した後に同じプロトコルで惹起される電流を測定し、post 値/pre 値を増強の指標とした。細胞内カルシウムイオン濃度は、Fura-2 の蛍光変化を FDSS/IMACS システムを用いて測定した。化合物の神経興奮に対する効果は、in vitro epilepsy モデル (Na^+ 感受性色素 SBF1 を取り込ませたラット海馬初代神経細胞に 4-AP を投与し、細胞内 Na^+ 濃度上昇を測定することにより、てんかん様波形を調べる) を用いて検討した。

(結果)

1.2 μM Ionomycin 存在下で、+100 mV へのステップパルスで大きな BK チャネル電流が観察されたが、電流値に大きなばらつきが見られた。変動の原因として細胞内 Ca^{2+} 濃度が関与している可能性を考慮し、細

胞外に BAPTA-AM を加えたところ、電流値は減少したが、変動は小さくなった。BAPTA-AM 存在下または非存在下で細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、BAPTA-AM 処置群で細胞間のばらつきが大きく減少していた。BK チャネルの阻害剤である NS1619 と 12,14-dichlorodehydroabietic acid (diCl-DHAA) の効果を調べたところ、BAPTA-AM 非存在下では 30 μM 以上でしか有意な増強効果が見られなかったのに対し、BAPTA-AM 存在下では 10 μM から有意な効果を観察することができた。そこで、この条件下で 38 種の化合物の BK チャネル開口活性を検討した結果、NS1619 に匹敵する新規 BK チャネル開口薬を見出すことができた。これらの化合物の *in vitro* epilepsy モデルにおける効果を調べたところ、BK チャネル開口薬の特徴である二相性の反応（低濃度で神経興奮抑制、高濃度で神経興奮惹起）が見られ、その効果は BK チャネル阻害剤の同時処理により消失した。

(考察)

BAPTA-AM 存在下で BK チャネル電流が安定化したことから、基底状態における細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動が、BK チャネル活性に影響を与えていたことが分かった。本研究で見出した条件は、他のカルシウムイオン依存性チャネル（SK チャネル、カルシウムイオン依存性 Cl チャネルなど）の測定にも応用できることから、イオンチャネルの研究および創薬に貢献すると考えられる。本研究で見出した新規 BK チャネル開口薬は特異性が高く、薬理的なツールとして有効であると考えられる。また、BK チャネルはてんかんの発症と関係していると考えられることから、BK チャネル開口薬はてんかん治療薬として有望であり、今後、本研究で見出した化合物をもとに、ヒトの疾患治療に用いることのできる医薬品の開発につながる可能性を持っている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

BK チャネルのオートメーション・パッチクランプ機器を用いたアッセイ系を確立し、新規 BK チャネル開口薬を見出したことは、イオンチャネルを標的とした創薬の新局面を開拓するものとして高く評価することができる。化合物の脳内移行や高濃度での神経興奮惹起などの問題もあるが、今後、これらの欠点を克服し、新たな治療薬を開発することにつながる可能性を秘めたポテンシャルの高い研究成果である。

平成 25 年 1 月 8 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。